پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۱۰ شمارۀ۲، نیمۀ دوم ۱۳۹۸، صفحۀ ۷۶-۶۲
نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 2, 2019, p. 62-76 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v10i2.64299

تأثیر ریزوباکترهای محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خصوصیات فیزیولوژیکی و رشد ریشه چهار رقم نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط دیم استان ایلام

رحیم ناصری[1]*، عباس سلیمانی‌فرد[2]، امیر میرزایی[3]، فرشته دارابی[1] و امین فتحی[4]

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام (به‌ترتیب، rahim.naseri@gmail.com و m.darabi8161@gmail.com)
۲- مربی، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی: ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران، soleymani877@gmail.com
۳- بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران، amir.mirzaei53@gmail.com
۴- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران، amin_agronomist@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰

چکیده

به منظور بررسی اثر ریزوباکترها محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خصوصیات فیزیولوژیکی و رشد ریشه چهار رقم نخود در شرایط دیم استان ایلام، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه مرکز تحقیقات کشاورزی سرابله اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل سه رقم نخود (هاشم، آزاد و آرمان) و توده محلی و ریزوباکترها محرک رشد و کود شیمیایی نیتروژن (عدم مصرف کود نیتروژن، ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن، ۲۰کیلوگرم کود نیتروژن، *آزسپریلیوم برازیلنس* (*Azospirillum brasilense*)+ عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن، *آزسپریلیوم برازیلنس*+۱۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن، *آزسپریلیوم برازیلنس*+۲۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن، *ازتوباکتر کروکوم* (*Azotobacter chroococcum*)+ عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن، *ازتوباکتر کروکوم*+۱۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن و *ازتوباکتر کروکوم*+۲۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن) درنظرگرفته شدند. اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر خصوصیات فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان و صفات ریشه معنی‌دار بود. استفاده از ریزوباکتری‌ها محرک رشد میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای آب نسبی را افزایش و موجب کاهش مالون‌دی‌آلدئید گردید. استفاده از این ریزوباکترها در تمامی ارقام مورد استفاده موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین موجب افزایش سیستم ریشه گردید. در این پ ژوهش ارقام هاشم و آزاد به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی به *ازتوباکتر* واکنش بهتری نشان دادند. رقم آزاد به‌علاوه آزسپریلیوم + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن دارای بیشترین میزان کلروفیلa و b، محتوای آب نسبی، فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز، پرکسیداز، حجم ریشه، وزن‌خشک ریشه و طول ریشه بود و توده محلی به‌علاوه تیمار شاهد (عدم مصرف کود نیتروژن) کمترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خصوصیات فیزیولوژیکی و رشد ریشه را در شرایط دیم دارا بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، عملکرد دانه، محتوی آب نسبی، میزان کلروفیل

مقدمه

حبوبات به دلیل برخورداری از پروتئین بیشتر دانه نسبت به سایر محصولات زراعی از اهمیت غذایی بالایی برخوردار می‌باشند. این گیاهان به دلیل قابلیت همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کنندۀ نیتروژن مولکولی، در تعادل عناصر معدنی خاک در بوم‌نظام‌های زراعی حائز اهمیت هستند. نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی مهم‌ترین از گیاهان این خانواده است. سطح زیرکشت گیاه نخود در دنیا حدود ۱۱میلیون هکتار بوده و ایران با سطح زیرکشت حدود ۷۰۰هزار هکتار، رتبه چهارم را در جهان پس از هندوستان، پاکستان و ترکیه دارا می‌باشد (Naseri *et al*., 2011).

کشاورزی پایدار، فعالیتی علمی و مبتنی بر اصول اکولوژیک است که هدف اصلی آن ایجاد حالت تعادل و رسیدن به پایداری در تولید می‌باشد (Koocheki *et al*., 2014). استفاده گسترده از کودهای شیمیایی یکی از مشکلات اصلی در محیط زیست و عامل افزایش هزینه است. مصرف کود شیمیایی در محیط منجر به افزایش فرسایش خاکی و در نتیجه ایجاد روان‌آب‌ها می‌گردد (Azadi *et al*., 2013)، بنابراین

* **نویسنده مسئول:** rahim.naseri@gmail.com

ریزوباکتری‌ها محرک رشد به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای کودهای شیمیایی، به منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات در کشاورزی پایدار مطرح شده‌اند (Wu *et al*., 2005).

ریزوباکترهای محرک رشد به عنوان مایه تلقیح میکروبی قابلیت دراختیارگذاشتن عناصر غذایی خاک از حالت غیرقابل دسترس به دسترس را برای گیاه زراعی از طریق فرآیندهای بیولوژیک دارند(Soleymani Fard & Nseri, 2014). باکتری‌های جنس *ازتوباکتر*، *آزسپیریلوم* و *سودوموناس* از مهم‌ترین ریزوباکترهای محرک رشد گیاه می‌باشند که علاوه بر تثبیت زیستی نیتروژن، با تولید مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای از هورمون‌های تحریک‌کننده رشد به‌ویژه انواع اکسین، جیبرلین و سیتوکنین، ضمن بهبود رشد و نمو گیاه موجب مقاومت به تنش‌های خشکی و شوری می‌گردند (Nadeem *et al*., 2007). تنش خشکی موجب تغییر در متابولیسم گیاهان می شود. این امر بر تعادل هورمونی تأثیر خواهد گذاشت و منجر به تولید اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه تنش اکسیداتیو خواهد شد. تجمع یون‌های سمی و ROSها تعادل روابط آبی و عناصر غذایی در گیاه را بر هم زده و از این طریق، رشد و نمو را با نقصان مواجه می‌سازد. ROSها دارای خاصیت اکسیدکنندگی قوی هستند و می‌توانند سبب خسارت به چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و حتی خود غشاء سلول‌ها شوند (Heidari *et al*., 2013).

به منظور کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از تولید ROSها گیاهان از یک‌سری ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی به عنوان سیستم آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنند. در بین ترکیبات غیرآنزیمی، ترکیبات آب‌دوست همانند آسکوربات و از ترکیبات چربی‌دوست، کاروتنوئیدها و در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، مواردی نظیر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) باعث حذف و غیرفعال‌کردن ROSها می‌شوند (Bencze *et al*., 2011). ریزوباکتری‌ها محرک رشد با تولید آنتی‌اکسیدانت یا تعدیل فتوسنتز از طریق ROSها به گیاهان کمک می‌کنند (Yang *et a*l. 2009). Creus *et al*, (2004) اظهار داشتند که تحت تنش خشکی عملکرد دانه گندم (*Triticum aestivum* L.) به دلیل استفاده از باکتری *آزسپریلیوم* کمتر کاهش یافت و دلیل این امر را افزایش محتوای آب نسبی و پتانسیل آب بیان کردند. کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش خشکی مربوط به افزایش تولید رادیکال-های اکسیژن در سلول عنوان شده است. این رادیکال‌ها سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌شوند (Sheteawi & Tawfik, 2007). نشان داده شده است که باکتری *آزسپریلیوم* تحت تنش خشکی به دلیل افزایش محتوای آب نسبی و پتانسیل آب موجب بهبود عملکرد دانه می‌گردد (Creus *et al*., 2004) که دلیل این افزایش عملکرد، کاهش اثرات بازدارندگی خشکی روی ریشه‌ها و توسعه مؤثرتر سیستم ریشه برای جذب آب در تیمارهای تلقیح‌شده عنوان گردیده است (Zahir *et al*., 2008). در گزارش‌های Syndhya *et al*., 2010 *آزسپریلیوم* موجب بهبود زیست‌توده گیاهی و بهترشدن روابط آبی و کاهش تلفات آب در گیاه گردید. ریزوباکتری‌های محرک رشد از طریق تولید هورمون اکسین بر مورفولوژی ریشه اثر گذاشته و موجب افزایش سطح ریشه می‌گردند. افزایش رشد ریشه لوبیا را به تولید هورمون های گیاهی توسط *آزسپریلیوم* برازیلنس نسبت داده‌اند (German *et al*., 2000).

در شرایط اقلیمی ایلام، نخود معمولاً در دوره رشد رویشی تحت تأثیر تنش خشکی متناوب قرار می‌گیرد و در مرحله رشد زایشی با تنش خشکی انتهایی و گرما به صورت توأم مواجه می‌شود. از آنجا که آب قابل‌دسترس، عامل اصلی محدودکننده رشد در زراعت دیم می‌باشد، لذا یکی از راهکارهای بهبود تغذیه و رشد گیاه، استفاده از ریزوباکترهای محرک رشد است. ریزوباکترهای محرک رشد دارای خصوصیاتی هستند که می توانند با تأثیر بر گیاه از طریق بهبود شرایط تغذیه‌ای آن سبب افزایش مقاومت نسبت به عوامل نامساعد محیطی در زراعت دیم شوند. بنابراین هدف از اجرای این پ ژوهش تأثیر ریزو- باکتری‌ها محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خصوصیات فیزیولوژیکی و رشد ریشه چهار رقم نخود در شرایط دیم استان ایلام بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی سرابله شهرستان سیروان، ایلام با عرض جغرافیایی ۳۳درجه و ۴۷دقیقۀ شمالی و طول جغرافیایی ۴۶درجه و ۳۶دقیقۀ شرقی با ارتفاع ۹۷۵متر از سطح دریا به صورت کشت دیم اجرا شد. متوسط بارندگی درازمدت سالیانه این منطقه ۶۰۰میلی‌متر و میانگین بارندگی طی فصل رشد ۳۲۶میلی‌متر بود (جدول ۱).

قبل از انجام آزمایش نمونه مرکب خاک محل آزمایش از عمق ۳۰-۰سانتی‌متر تهیه شد. خلاصه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج تجزیه خاک، نیازی به مصرف کود شیمیایی پتاسیم و فسفر در شرایط دیم نبود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

جدول ۱- شرایط آب و هوایی محل اجرای آزمایش در سال زراعی۹۴-۱۳۹۳

Table 1. Results of climatic properties of experimental location in 2014-2015

ماه	Month	بارندگی (میلی‌متر) Precipitation (mm)	دمای حداقل مطلق ماهانه (درجۀ سانتی‌گراد) Monthly absolute minimum temperature (ºC)	دمای حداکثر مطلق ماهانه (درجۀ سانتی‌گراد) Monthly absolute maximum temperature (ºC)	رطوبت نسبی (درصد) Relative humidity (%)	تبخیر (میلی‌متر) Evaporation (mm)
مهرماه	October	50.7	5.4	34.8	44	151.1
آبان	November	77.7	0.2	26.4	59	65.4
آذر	December	45.1	1.2	19.6	70	26.7
دی	January	17.2	-4.6	18	64	6.6
بهمن	February	15.7	-1.6	20.2	55	0
اسفند	March	52.9	-4.4	23	55	0
فروردین	April	58.9	1.2	31	55	181.9
اردیبهشت	May	7.5	3	36.6	32	269.9
خرداد	June	0.1	15.6	41	20	400.6
تیر	July	0	18	45.2	22	395

تیمارهای آزمایش شامل سه رقم نخود (هاشم، آزاد و آرمان) و توده محلی و ریزوباکتری‌ها محرک رشد و کود شیمیایی نیتروژن (عدم مصرف کود نیتروژن، ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن، ۲۰کیلوگرم کود نیتروژن، *آزسپریلیوم* برازیلنس (*Azospirillum brasilense*)+عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن، *آزسپریلیوم برازیلنس*+۱۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن، *آزسپریلیوم برازیلنس*+۲۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن، *ازتوباکتر* کروکوم+عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن، *ازتوباکتر کروکوم* (*Azotobacter chroococcum*)+ ۱۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن و *ازتوباکتر* کروکوم + ۲۰کیلوگرم کود شیمیایی نیتروژن) درنظرگرفته شدند. زمین محل آزمایش یک سال قبل از کاشت شخم‌زده و بقایای محصول سال قبل در داخل خاک مدفون گردید. هموارکردن زمین نیز با ماله انجام شد. عملیات کاشت ۲۵آبان انجام شد. تراکم کاشت تمامی ارقام مورد مطالعه ۴۰بوته در مترمربع درنظرگرفته شد. در موقع کاشت، بیش از میزان لازم بذر مصرف شد و بعد از سبزشدن با تنک‌کردن، فاصله بوته‌ها در هر ردیف تنظیم شد.

جدول ۲- نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 2. Results of soil physical and chemical properties of experimental location

بافت خاک Soil Texture	روی قابل‌جذب Available Zinc mgkg^{-1}	پتاسیم قابل جذب Available Potassium mgkg^{-1}	فسفر قابل جذب Available Phosphor mgkg^{-1}	نیتروژن کل Total Nitrogen %	هدایت الکتریکی EC dSm^{-1}	اسیدیته‌گل اشباع pH	عمق Depth cm
Silty Clay Loam	0.92	320	15	0.5	0.35	7.5	0-30

هر کرت شامل شِش ردیف شِش‌متری با فواصل ردیف ۳۰سانتی‌متری و فواصل ۶۰سانتی‌متری بین کرت‌های اصلی و دو متر بین تکرارها درنظرگرفته شد. به منظور یکنواختی بیشتر کشت به‌صورت دستی انجام شد. هم‌زمان با تنک کردن، وجین علف‌های‌هرز به صورت دستی انجام شد. قبل از کاشت، برای تلقیح بذرها میزان هفت گرم مایه‌تلقیح- که هر گرم آن دارای 10^7عدد باکتری زنده (Azadi *et al*., 2013) و فعال برای هر دو نوع ریزوباکتری‌ها محرک رشد بود- تهیه‌شده از بخش بیولوژی مؤسسه خاک و آب، مورد استفاده قرار گرفت و با آب شکر به غلظت دو درصد، آغشته شد.

میزان کود نیتروژن بر اساس آزمون خاک و توصیه کارشناسان بخش آب و خاک، در زمان کاشت و از منبع کود اوره تأمین و اعمال شد. به منظور استخراج و اندازه‌گیری صفات آنتی‌اکسیدانت و فیزیولوژیکی در مرحله گلدهی از برگ‌های بالایی و کاملاً توسعه‌یافته اقدام به نمونه‌گیری و به‌وسیله تانک نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج و اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

به منظور استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا از هر تیمار ۰/۵گرم نمونه برگ تازه در نیتروژن مایع کاملاً خرد شد. سپس دو میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس اسیدکلریدریک با اسیدیته ۷/۵) به آن اضافه گردید و در داخل هاون چینی به‌طور کامل هموژنیزه شد. نمونه‌های هموژن‌شده به مدت ۱۵دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. از عصاره بالایی حاصل جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد (Ramachandra-Reddy *et al*., 2004). در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Chance & Maehly, 1995).

برای سنجش مالون‌دی‌آلدئید، مقدار ۰/۵گرم از نمونه برگ تاز در هاون خرد شد. پودر برگ خردشده درون لوله فالکون‌های ۱۵میلی‌لیتری ریخته شد. سپس مقدار ۵میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰میلی‌مولار (pH=۷) که در درون ظرف یخ قرار داشت، به آن اضافه گردید. فالکون‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به تیوپ‌های دو میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵درصد اسید تیوباربیوتیک حاوی اسید تری کلرواستیک ۲۰درصد به آن افزوده شد. مخلوط در حمام آب داغ (۱۰۰درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰دقیقه حرارت داده شد. سپس به منظور توقف واکنش، ظرف محتوی مخلوط حرارت‌داده‌شده به سرعت درون حمام یخ قرار گرفت. مخلوط سردشده با سرعت ۱۰۰۰۰دور در دقیقه به مدت۱۰دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مخلوط به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۵۳۲نانومتر و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (جذب در طول موج دوم جذب چربی‌های غیرخالص است که باید از جذب در طول موج اول کم شود و در محاسبه مقدار MDA ضریب خاموشی ۱۵۵ $cm^{-1}mM^{-1}$ نیز لحاظ گردید (Stewart & Bewley, 1980).

میزان کلروفیلa و b در آغاز گلدهی از نمونه برگی به کمک روش Lichtenthaler & wellburn (1983) اندازه‌گیری شد. به این صورت که ۰/۲۵گرم برگ تازه را با استفاده از ۵میلی‌لیتر آب‌مقطر در هاون چینی کاملاً ساییده و سپس حجم آن با آب مقطر به ۱۲/۵میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵میلی‌لیتر از عصاره نمونه برداشته و با ۴/۵میلی‌لیتر استون ۸۰درصد مخلوط شد و محلول حاصل به مدت ۱۰دقیقه در ۳۰۰۰دور سانتریفیوژ و سپس میزان جذب نور توسط عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج‌های ۶۶۳ (کلروفیلa) و ۶۴۶ (کلروفیل b) تعیین گردید. غلظت کلروفیلa و b از طریق معادله‌های زیر به دست آمدند:

معادله ۱ $\text{Chlorophyll a}=12.21\,(A_{663})-2.81(A_{646})$

معادله ۲ $\text{Chlorophyll b}= 20.13(A_{646})- 5.03(A_{663})$

در مرحله گلدهی کامل محتوی آب نسبی برگ با استفاده از روش Sanchez (1998) و با استفاده از معادله Levitt (1980) به شرح زیر اندازه‌گیری شد:

معادله ۳
$$RWC(\%) = \frac{wt - wd}{wt - wd} \times 100$$

Wf: وزن تر بافت گیاه، Wt: وزن آماس‌یافته گیاه (اشباع‌شده از آب)، Wd: وزن خشک بافت گیاه.

جهت اندازه‌گیری خصوصیات ریشه در هر بوته در مرحله گلدهی از یک پروفایل مکعبی شکل به ابعاد ۵۰سانتی‌متر که به صورت دستی ایجاد شده بود، استفاده گردید. سپس پس از شستشوی ریشه، اقدام به اندازه‌گیری حجم ریشه، وزن‌خشک و طول اصلی ریشه گردید. حجم ریشه از طریق اختلاف حجم ایجادشده پس از قراردادن ریشه در حجم مشخصی از آب محاسبه شد. پس از قراردادن ریشه‌ها در ۷۲درجه به مدت ۴۸ساعت اقدام به اندازه‌گیری وزن‌خشک ریشه‌ها گردید. برداشت نهایی و تعیین عملکرد دانه با رعایت اثر حاشیه و حذف دو ردیف کاشت کناری و ۵۰سانتی‌متر از طرفین، از دو ردیف کاشت به طول شش متر از سطحی معادل چهار و نیم مترمربع انجام شد. برای تجزیه آماری، از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر میزان کلروفیلa و b معنی‌دار بود (جدول ۳) و استفاده از ارقام تلقیح شده با ریزوباکتری‌ها محرک رشد موجب افزایش میزان کلروفیلa و b گردید. بیشترین میزان کلروفیلa و b در رقم آزاد و تیمار *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین میزان کلروفیلa و b در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن و عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد مشاهده شد (جدول ۴). واکنش ارقام مورد استفاده در تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد متفاوت بود. ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌طوری‌که میزان این صفات در رقم آرمان و توده محلی در تیمار کاربرد *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب ۶۶ و ۶۵درصد نسبت به

تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن و عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) افزایش نشان داد. رقم آزاد و هاشم با تیمار کاربرد *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن و عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) به ترتیب ۶۳ و ۵۸درصد افزایش نشان دادند (جدول ۴).

داده‌های هواشناسی که بر اساس روز از هواشناسی استان استخراج گردید، نشان داد که آخرین بارندگی فروردین‌ماه در ۲۱ و در ماه اردیبهشت جمعاً شامل ۷/۵میلی‌متر بارندگی (جدول ۱) در تاریخ‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۱ به ترتیب ۳/۴، ۱/۹ و ۲/۲ میلی‌متر بودیم. همان‌طورکه آمار هواشناسی نشان می‌دهد میزان بارندگی در اردیبهشت‌ماه چنان نبود که بتواند مورد استفاده گیاه قرار گیرد و در شرایط دیم بارندگی زیر ۱۰میلی متر جزء بارندگی‌های مؤثر نمی‌باشد. بر اساس زمان نمونه-برداری که در تاریخ ۲۸اردیبهشت‌ماه بود و تا برداشت نهایی هیچ‌گونه بارندگی در منطقه دیگر صورت نگرفت. بنابراین مسلماً گیاه با تنش خشکی به دلیل نبود بارندگی و به دنبال آن گیاه نخود با افزایش دما و تنش گرمایی مواجه می‌گردد.

ارقام مورد استفاده به همراه ریزوباکتری‌ها محرک رشد به دلیل رشد رویشی بهتر گیاه نخود دارای بیشترین میزان کلروفیلa و b نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن و عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) در طول فصل رشد بودند. به نظر می‌رسد که در ارقام مورد پژوهش و ریزوباکتری‌ها محرک رشد تنش رطوبتی و مواد غذایی به‌طور قابل‌توجهی به دلیل سیستم گسترده ریشه در این تیمارها کمتر است (جدول ۶). سیستم فتوسنتز برگ‌ها نسبت به تنش گرما حساس می‌باشد و میزان فتوسنتز به دلیل تنش گرما بر میزان کلروفیل، قطع جریان الکترون، تغییرپذیری گرمایی فتوسیستمII و کاهش کربن تثبیت‌شده کاهش می‌یابد (Kaur *et al*., 2015). Gregersen & Holm (2007) بیان داشتند که طی تنش خشکی محتوی کلروفیل کاهش یافت و ارقام گندم دارای محتوای کلروفیل بالاتر، مقاومت بیشتری در شرایط تنش از خود نشان دادند. غلظت کلروفیل برگ که نشانه پایداری فتوسنتز در گیاهان می‌باشد، به دلیل افزایش تجزیه آن تحت تنش گرما، کاهش می‌یابد (Kaur *et al*., 2015). در یک گزارش (Saghafi *et al*., 2013) بر روی گندم نشان داده شد که ریزوباکترهای محرک رشد در مقایسه با تیمار شاهد (عدم تلقیح) موجب افزایش صفات فیزیولوژیکی گردید، به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیلa در تلقیح با این باکتری‌ها مشاهده گردید. گزارش‌ها مبنی بر این است که ریزوباکترهای محرک رشد از طریق کمک به جذب نیتروژن، فسفر، گوگرد و نقشی که این عناصر در تولید کلروفیل و تأمین آنزیم‌های مورد نیاز گیاه دارند، باعث افزایش میزان بافت‌های فتوسنتزی در گیاهان می‌شوند (Yousefpour *et al*., 2014).

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر میزان محتوای آب نسبی معنی‌دار بود (جدول ۳). استفاده ارقام نخود تلقیح‌شده با *ازتوباکتر* و *آزسپریلیوم* موجب افزایش میزان محتوای آب نسبی گردید. بیشترین میزان محتوای آب نسبی در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین میزان محتوای آب نسبی در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۶۹درصد افزایش نشان داد (جدول ۴).

واکنش برهمکنش ارقام مورد استفاده در تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد متفاوت بود. ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌گونه‌ای‌که استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب افزایش معنی‌دار میزان محتوای آب نسبی گردید، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۵ و ۶۷درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد خود نشان داد. رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۳ و ۶۱درصد افزایش نشان دادند. بالابودن میزان محتوای آب نسبی ارقام نخود در حضور ریزوباکترهای محرک رشد را می‌توان به وضعیت بهتر گیاه در طول دوره رشد به دلیل نقش این باکتری‌ها بر سیستم ریشه‌دهی مرتبط دانست.

در گزارش Naveed *et al*, (2014) نشان داده شد که محتوای آب نسبی در تنش خشکی کم و استفاده از ریزوباکترهای محرک رشد موجب افزایش محتوای آب نسبی گردید. کاهش محتوای آب در بافت‌های گیاهان تحت شرایط تنش خشکی باعث محدودشدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی در آن‌ها می‌گردد (Heidari & Karami, 2013). در گزارش Creus *et al*, (2004) بیان شد که عملکرد دانه به دلیل استفاده از باکتری *آزسپریلیوم* افزایش نشان داد. آن‌ها دلیل این امر را افزایش محتوای آب نسبی و پتانسیل آب بیان کردند که دلیل این امر کاهش اثرات بازدارندگی خشکی روی ریشه‌ها و توسعه مؤثرتر سیستم ریشه

برای جذب آب در تیمارهای تلقیح شده عنوان گردید (Zahir *et al*., 2008).

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر میزان مالون‌دی‌آلدئید معنی‌دار بود (جدول ۳). ارقام نخود به همراه استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد موجب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید گردید. کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۷۵/۳درصد افزایش نشان داد (جدول ۴).

در این مطالعه برهمکنش ارقام مورد استفاده و ریزوباکتری‌های محرک رشد بر میزان مالون‌دی‌آلدئید متفاوت بود. ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌گونه‌ای که استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌ها محرک رشد در تمامی ارقام موجب کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید گردید و رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر*+ ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۷ و ۶۵درصد کاهش نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند. رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۷۶ و ۶۵درصد کاهش نشان دادند (جدول ۴).

در گزارش Vardharajula *et al*, (2011) نیز نشان داده شد که نشت‌پذیری غشاء گیاه در شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد و تلقیح گیاه با ریزوباکترهای محرک رشد در مقایسه با تیمار عدم تلقیح گیاه موجب کاهش نشست‌پذیری غشاء می گردد. در گزارش Naveed *et al*, (2014) نشان‌داده شد که نشت‌پذیری غشاء در تنش خشکی زیاد شد و استفاده از ریزوباکترهای محرک رشد موجب کاهش نشت‌پذیری غشاء گردید.

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌های محرک رشد بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد بود که نسبت به تیمار شاهد ۶۵درصد افزایش نشان داد (جدول ۴). واکنش ارقام مختلف نخود مورد استفاده در تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز متفاوت و ارقام واکنش متفاوتی از خود نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به گونه‌ای که استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گردید. رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۰ و ۵۸درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند.

رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۵۲ و ۴۵درصد افزایش نشان دادند (جدول ۴). سازش گیاهان به شرایط تنش خشکی بستگی به افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در برابر افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال دارد. محتوای گونه‌های اکسیژن فعال در سیستم‌های بیولوژیک توسط دو نوع سیستم دفاع آنتی اکسیدانی شامل روش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کنترل می‌شود.

سیستم آنزیمی مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و غیره و سیستم غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن‌آسکوربیک اسید، آلفاتوکوفرول، گلوتاتیون می‌باشد (Xu *et al*., 2008). بر اساس مطالعات انجام‌شده کاهش عملکرد دانه گندم، اساساً به دلیل کاهش رشد، کاهش سرعت فتوسنتز، کاهش محتوای پروتئین‌های محلول برگ‌ها و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (Gunes *et al*., 2006). Ahmadizadeh (2011) نشان داد که تنش خشکی در ارقام مختلف گندم نان سرعت فعالیت این آنزیم را افزایش داده است. این موضوع نشان می‌دهد که گیاهان برای مقابله با خشکی و ازبین‌بردن گونه‌های اکسیژن فعال و مبارزه با تنش ایجادشده، سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت خود را افزایش می‌دهند. محققان نشان داده‌اند که تنش خشکی سبب کاهش صفات زراعی لوبیاقرمز (*Phaseolus vulgaris* L.) و افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده است و همچنین بیان کردند که افزایش آنزیم‌های فوق در شرایط تنش خشکی نشان‌دهنده اثر

این آنزیم‌ها در کاهش خسارات تنش اکسیداتیو و نقش مهم آن‌ها در مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد (Ardalani *et al*., 2014). ریزوباکترهای محرک رشد از طریق افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نقش مهمی را در محیط ریزوسفر از طریق فراهم‌سازی حذف رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند (Wang et al., 2007).

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و خصوصیات فیزیولوژیکی ارقام مختلف نخود تحت تأثیر ریزوباکترهای محرک رشد

Table 3. Analysis of variance of activities of antioxidative enzymes and physologiceal characteristics of different chickpea cultivars under PGPR

منابع تغییر S.O.V		درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	محتوی آب نسبی RWC	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	مالون دی آلدئید MAD	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase
Replication	تکرار	2	1.42	1.45	132.14	66.05	147.17	1307.46	132.51
Cultivar	رقم	3	0.80**	0.87**	263.03**	107.13**	193.63**	2815.03**	148.90**
Chemical and Bio-fertilizer	کود زیستی و شیمیایی	8	5.26**	2.74**	627.01**	68.69**	1098.96**	34143.18**	279.30**
Cultivar× chem- Bio-fertilizer	رقم× کود	24	0.073**	0.033**	46.73**	1.58*	39.89**	872.96**	8.19**
Error	خطا	70	0.009	0.0058	0.80	0.52	15.88	86.53	1.05
C.V%	ضریب تغییرات (درصد)	-	5.07	5.16	2.60	6.61	4.06	2.11	5.35

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at 5% and 1%, respectively

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود (جدول ۳). *ازتوباکتر* و *آزسپریلیوم* در این پژوهش در ارقام مختلف نخود سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۶۹درصد افزایش نشان داد (جدول۴). برهمکنش ارقام مورد استفاده در ریزوباکتری های محرک رشد متفاوت بود. ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌گونه‌ای که استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۶۱ و ۶۰درصد افزایش نشان داد.

رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۵۵ و ۵۹درصد افزایش نشان دادند (جدول ۴). نتایج تحقیقات نشان داد که افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به دلیل کاهش اثرات پراکسیداسیون در هنگام تنش‌های مختلف گیاهان زراعی گندم، جو (*Hordeum vulgare* L.)، سویا (*Glycine max* L.) و نخود در مقاومت گیاه به تنش نقش مهمی ایفا می‌کند (Esfandiari *et al*., 2007). در گزارش Chakraborty *et al*, (2013) نشان داده شد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در حضور ریزوباکتری‌های محرک رشد، زیاد گردید.

اثر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌های محرک رشد بر پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین میزان پراکسیداز در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین میزان پراکسیداز در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۶۶درصد افزایش نشان داد (جدول ۴). ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند. استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب

افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداز گردید، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۶۰ و ۶۶درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند.

جدول ۴- اثر متقابل ریزوباکتری‌های محرک رشد و رقم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و خصوصیات فیزیولوژیکی نخود

Table 4. Interaction effect of PGPR and cultivar on activities of antioxidative enzymes and physologiceal characteristics of chickpea

	صفات Traits / تیمار Treatment	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم برگ تازه) Chlorophyll a (mg/gFW)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم برگ تازه) Chlorophyll b (mg/gFW)	محتوی آب نسبی (درصد) RWC (%)	سوپر اکسید دیسموتاز (واحد آنزیمی در یک میلی‌گرم پروتئین) Superoxide Dismutase (enzyme per mg protein)	پراکسیداز (تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین) Peroxidase (absorption per minute per mg protein)	کاتالاز (تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین) Catalase (absorption per minute per mg protein)	مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم برگ تر) MAD (Nano mol per leaf)
Arman	*No inoculation*No N fertilizer*	0.966^{s}	0.766^{op}	30.33^{q}	11.33^{st}	5.66_{o}	6.46^{q}	84.33^{b}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	1.016^{rs}	0.866^{no}	31.66^{q}	12.83^{q-s}	7.16^{n}	7.46^{op}	74.33^{f}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	$1.066q^{rs}$	0.966^{mn}	35.33^{o}	13.83^{pq}	8.16^{l-n}	8.46^{mn}	69.33^{g}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	1.50^{lm}	1.20^{kl}	37.66^{n}	15.50^{n-p}	9.16^{j-l}	9.16^{lm}	49.33^{k}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	2.40^{ef}	1.90^{de}	76.00^{fg}	22.66^{de}	11.16^{gh}	14.16^{e}	34.33^{n}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	2.10^{g}	1.70^{fg}	71.66^{h}	20.00^{g-i}	10.66^{hi}	13.16^{f}	39.33^{m}
	*Azetobacter*No fertilizer*	1.70^{jk}	1.40^{ij}	42.66^{l}	17.53^{k-m}	9.66^{i-k}	10.16^{jk}	44.33^{l}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	2.866b	2.133^{a-c}	89.00^{b}	28.56^{a}	14.30^{b-d}	16.73^{bc}	27.33^{p}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	2.40^{ef}	1.800^{ef}	76.66^{f}	22.00^{d-f}	10.50^{n-j}	14.16^{e}	39.33^{m}
Azad	*No inoculation*No N fertilizer*	1.16^{pqr}	0.866^{no}	33.33^{p}	14.33^{o-q}	7.66^{mn}	7.46^{op}	74.33^{f}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	1.216^{o-q}	0.966^{mn}	35.33^{o}	15.76^{m-o}	8.16^{l-n}	8.46^{mn}	79.33^{d}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	1.266^{n-p}	1.066^{lm}	38.33^{n}	16.30^{l-n}	10.16^{h-j}	9.46^{kl}	74.33^{f}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	1.90^{hi}	1.50^{hi}	45.66^{k}	19.45^{g-j}	12.66^{ef}	11.16^{hi}	49.33^{k}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	3.153^{a}	2.266^{a}	91.33^{a}	30.5^{a}	16.16^{a}	16.73^{bc}	21.33^{r}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	2.50^{de}	1.90^{de}	79.66^{e}	23.66^{cd}	14.16^{b-d}	15.16^{d}	44.33^{l}
	*Azetobacter*No fertilizer*	1.70^{jk}	1.30^{jk}	40.66^{m}	17.50^{k-m}	12.16^{fg}	10.16^{jk}	54.33^{j}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	2.60^{cd}	2.00^{cd}	79.66^{e}	25.00^{bc}	14.16^{b-d}	15.16^{d}	39.33^{m}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	2.30^{f}	1.80^{ef}	74.66^{g}	22.00^{d-f}	13.66^{c-e}	14.16^{e}	44.33^{l}
Hashem	*No inoculation*No N fertilizer*	1.266^{n-p}	1.066^{lm}	35.33^{o}	16.33^{l-n}	9.66^{i-k}	7.46^{op}	79.33^{d}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	1.316^{n-p}	1.166^{kl}	37.33^{n}	17.83^{j-l}	10.16^{h-j}	10.46^{ij}	81.33^{c}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	1.366^{m-o}	1.266^{k}	40.33^{m}	18.66^{h-k}	12.16^{fg}	11.46^{gh}	76.33^{e}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	2.00^{gh}	1.70^{fg}	47.66^{j}	20.50^{f-h}	13.66^{c-e}	13.13^{f}	54.33^{j}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	3.00^{ab}	2.266^{a}	92.66^{a}	29.83^{a}	15.33^{ab}	18.16^{a}	23.66^{q}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	2.60^{cd}	2.10^{bc}	81.66^{d}	25.00^{bc}	15.16^{ab}	17.16^{b}	49.33^{k}
	*Azetobacter*No fertilizer*	1.80^{ij}	1.500^{hi}	42.66^{l}	18.50^{i-k}	13.16^{d-f}	12.16^{g}	59.33^{i}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	2.700^{c}	2.20^{ab}	81.66^{d}	26.00^{b}	15.16^{ab}	17.16^{b}	44.33^{l}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	2.40^{ef}	2.00^{cd}	76.66^{f}	23.00^{d}	14.66^{bc}	16.16^{c}	49.33^{k}
Mahali	*No inoculation*No N fertilizer*	0.916^{s}	0.666^{p}	28.33^{r}	10.33^{t}	5.16^{o}	5.66^{r}	86.33^{a}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	0.966^{s}	0.766^{op}	30.33^{q}	11.83^{r-t}	7.00^{n}	6.66^{pq}	69.33^{g}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	1.018^{rs}	0.866^{no}	33.33^{p}	12.83^{q-s}	7.66^{mn}	7.66^{no}	64.33^{h}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	1.40^{mn}	1.00^{mn}	35.66^{o}	13.50^{qr}	8.66^{k-m}	8.16^{no}	44.33^{l}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	2.30^{f}	1.70^{fg}	74.66^{g}	21.00^{e-g}	10.66^{hi}	13.16^{f}	29.33^{o}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	2.00^{gh}	1.50^{hi}	69.66^{i}	18.00^{j-l}	10.16^{h-j}	12.16^{g}	34.33^{n}
	*Azetobacter*No fertilizer*	1.60^{kl}	1.20^{kl}	40.66^{m}	15.50^{n-p}	9.16^{j-l}	9.66^{j-l}	39.33^{m}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	2.60^{cd}	2.11^{bc}	85.66^{c}	25.00^{bc}	13.03^{ef}	14.16^{e}	32.66^{n}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	2.30^{f}	1.60^{gh}	74.66^{g}	20.00^{g-i}	10.66^{hi}	13.16^{f}	34.33^{n}

میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within each column with a letter in common are not significantly different at α= 0.05.

رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۵۰ و ۴۰درصد افزایش نشان دادند (جدول ۴).

سایر گزارش‌ها نیز نشان داده شده است که بالابودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجب بالارفتن قدرت تحمل گیاه به تنش خشکی می‌گردد. فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز در ارقام مقاوم به خشکی گندم در مقایسه با ارقام حساس به خشکی مشاهده گردید (Sairam & Srivastava, 2001). Esfandiari & Vahdati (2012) گزارش کردند که با افزایش سن برگ توان دفاعی سلول کاهش یافته و میزان تولید اکسیدان‌ها بیش از جمع‌آوری آن‌هاست؛ بنابراین در اواخر رشد توانایی محافظتی سلول در مقابل رادیکال‌های اکسیژن فعال کاهش می‌یابد و سلول دچار تنش اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مثل کاتالاز در تیمار ریزوباکترها محرک رشد مثل *آزسپریلیوم* در سایر گزارش‌ها نیز آمده است (Heidari & Golpayegani, 2011).

اثر برهمکنش رقم در ریزوباکتری‌ها محرک رشد بر حجم ریشه معنی‌دار بود (جدول ۵). بیشترین حجم ریشه نخود در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین حجم ریشه در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد بود که نسبت به تیمار شاهد ۹۰درصد افزایش نشان داد (جدول۶). استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب افزایش معنی‌دار حجم ریشه گردید، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۸۴ و ۸۸درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد خود نشان داد. رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۷۵ و ۶۵درصد افزایش نشان دادند (جدول ۶). تحقیقات نشان داده‌اند که سامانه ریشه‌ای عمیق‌تر تأثیر بیشتری بر عملکرد خواهد داشت. همچنین نتایج نشان داده است که تراکم ریشه در اعماق بیشترین تأثیر را بر میزان عملکرد در شرایط تنش خشکی دارد، زیرا در شرایطی که آب تنها در اعماق پایین ذخیره شده است، وجود ریشه در این نواحی می‌تواند رشد گیاه را تضمین کند (Jongrungklang *et al.*, 2012). ریزوباکتری‌های محرک رشد به دلیل تولید هورمون‌ها از جمله اکسین سبب تغییر در سیستم ریشه‌دهی می‌شوند که موجب افزایش سطح ریشه، طول مخصوص ریشه و سطح مخصوص ریشه می‌گردد (German *et al.*, 2000).

برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌های محرک رشد بر وزن‌خشک ریشه معنی‌دار بود (جدول ۵). بیشترین وزن‌خشک ریشه در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین وزن‌خشک ریشه در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۸۳درصد افزایش نشان داد (جدول ۶). ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند. استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد در تمامی ارقام موجب افزایش وزن‌خشک ریشه گردید، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۷۶ و ۸۱درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند. رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۷۴ و ۶۸درصد افزایش نشان دادند (جدول۶). در بسیاری از تحقیقات نشان داده شده است که پیش‌تیمار با *آزسپیریلوم* سبب افزایش حجم و تعداد ریشه شده است (Bashan *et al.*, 1989). اندازه‌گیری‌ها نشان داده که حتی در شرایط تنش خشکی شدید، مقدار قابل‌توجهی رطوبت در اعماق خاک وجود دارد که با اصلاح صفاتی مانند افزایش نفوذ و گسترش ریشه می‌توان از آن بهره گرفت. گزارش Manske *et al*, (1995) نشان داد که باکتری *ازتوباکتر کروکوکوم* با تولید هورمون‌های گیاهی، رشد طولی و تراکم طول ریشه‌های گندم را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد.

واکنش ارقام تلقیح‌شده با *ازتوباکتر* و *آزسپریلیوم* بر طول ریشه اصلی معنی‌دار (جدول۵) بود و استفاده از این ریزوباکتری‌های محرک رشد موجب افزایش این صفت گردید. بیشترین طول ریشه اصلی در رقم آزاد به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن و کمترین طول ریشه اصلی در توده محلی و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۷۳درصد افزایش نشان داد (جدول ۶). در این آزمایش واکنش برهمکنش ارقام مورد استفاده و ریزوباکتری‌های محرک رشد متفاوت بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و

۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۷ و ۶۴درصد افزایش نشان داد. رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* + ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۴ و ۵۷درصد افزایش نشان دادند (جدول ۶). گیاهان متحمل به تنش خشکی برای استفاده بهینه از آب موجود در خاک در شرایط کمبود آب طول ریشه خود را افزایش می‌دهند و این افزایش طول ریشه با کاهش قطر ریشه همراه است و در نتیجه، ریشهٔ گیاه بهتر می‌تواند به منافذ خاک نفوذ و آب را جذب کند.

نشان داده شده است که باکتری *آزسپریلیوم* به دلیل تولید گاز نیتریک اکسید موجب ایجاد هورمون اکسین می‌شود که سبب افزایش گیاه در برابر تنش خشکی می‌گردد و به رشد ریشه در گیاه کمک می‌کند (Molina-Favero *et al*., 2008). باکتری *آزسپریلیوم* موجب افزایش سطح ریشه، طول مخصوص ریشه و سطح مخصوص ریشه در مقایسه با تیمار شاهد در لوبیا گردید (German *et al*., 2000).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که عملکرد دانه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر برهمکنش رقم و ریزوباکتری‌های محرک رشد قرار می‌گیرد (جدول ۵). نتایج حاصله، نشان‌دهنده برتری ارقام مورداستفاده به همراه ریزوباکتری‌های محرک رشد نسبت به تیمار شاهد بود. بیشترین عملکرد دانه در رقم آزاد و تلقیح با *آزسپریلیوم* و کمترین عملکرد دانه در رقم آرمان و عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد بود که نسبت به تیمار شاهد (عدم استفاده از کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۵/۴درصد افزایش نشان داد (جدول ۶).

به نظر می‌رسد که استقرار و رشد زودتر در ابتدای فصل رشد، سبب استفاده بیشتر از شرایط مساعد محیطی شده و از طرف دیگر، اجزای عملکرد گیاه کمتر تحت تأثیر تنش رطوبتی و حرارتی در اواخر فصل رشد قرار گرفته باشد. واکنش ارقام تلقیح‌شده با *ازتوباکتر* و *آزسپریلیوم* معنی‌دار و استفاده از این ریزوباکتری‌های محرک رشد موجب افزایش این صفت گردید.

در این مطالعه همچنین مشاهده گردید که واکنش برهمکنش ارقام مورد استفاده و ریزوباکتری‌های محرک رشد متفاوت می‌باشد. ارقام هاشم و آزاد واکنش بهتری به *آزسپریلیوم* و رقم آرمان و توده محلی واکنش بهتری به *ازتوباکتر* از خود نشان دادند، به‌طوری‌که رقم آرمان و توده محلی به‌علاوه *ازتوباکتر* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد خود (عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌ها محرک رشد) ۶۰ و ۵۶درصد افزایش نشان دادند.

رقم آزاد و هاشم به‌علاوه *آزسپریلیوم* و ۱۰کیلوگرم کود نیتروژن به ترتیب نسبت به تیمار شاهد (عدم مصرف کود شیمیایی نیتروژن به‌علاوه عدم تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد) ۵۹ و ۴۹درصد افزایش نشان دادند (جدول ۶). ترشح مواد تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها توسط *آزسپریلیوم* و *ازتوباکتر* به دلیل همیاری باکتری نخست با ریشه، مهم‌ترین سازوکار افزایش رشد و عملکرد دانه عنوان شده است. با توجه به این نتایج و این واقعیت که ریزوباکتری‌های محرک رشد مورداستفاده دارای قابلیت تولید تحریک‌کننده رشد گیاه هستند، به نظر می‌رسد همین سازوکار در افزایش عملکرد مؤثر بوده است (Hamidi *et al*., 2009).

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس رشد ریشه ارقام مختلف نخود تحت تأثیر ریزوباکتری‌های محرک رشد

Table 5. Analysis of variance for Interaction effect of root growth of different chickpea cultivars under PGPR

منابع تغییر S.O.V		درجه آزادی d.f	حجم ریشه Root volume	وزن خشک ریشه Root dry weight	طول ریشه Root lenght	کل گره Total of nodal	گره فعال Active nodal	عملکرد دانه Grain yield
Replication	تکرار	2	4.25	3.47	197.76	130.95	80.21	0.00055578
Cultivar	رقم	3	17.54**	9.64**	129.77**	91.47**	68.55**	0.00176310**
Chemical and Bio-fertilizer	کود زیستی و شیمیایی	8	79.44**	114.69**	632.96**	285.05**	666.97**	0.00898719**
Cultivar× chem- Bio-fertilizer	رقم× کود	24	0.98**	0.66**	15.70**	4.15**	3.57**	0.00022260**
Error	خطا	70	0.09	0.15	0.75	0.28	0.52	0.00006054
C.V%	ضریب تغییرات (درصد)	-	5.28	5.59	3.52	3.98	5.88	8.10

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at 5% and 1%, respectively

جدول ۶- اثر متقابل ریزوباکتری‌های محرک رشد و رقم بر عملکرد دانه و رشد ریشه نخود

Table 6. Interaction effect of PGPR and cultivar on grain yield and root growth of chickpea

	صفات Traits / تیمار Treatment	عملکرد دانه (کیلوگرم در مترمربع) Grain yield ($kg.m^{-2}$)	تعداد گره در بوته Total of nodal (number)	تعداد گره فعال در بوته Active nodal (number)	حجم ریشه در بوته (سانتی‌متر مترمکعب) Root volume (cm^3)	وزن خشک ریشه در بوته (گرم) Root dry weight in plant (g)	طول ریشه اصلی (سانتی‌متر) Root length (cm)
Arman	*No inoculation*No N fertilizer*	0.0561st	18^{r}	8.83^{wx}	1.43^{rs}	2.44^{s-u}	11.96^{s}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	0.0602^{r-t}	20.5^{p}	10.22^{t-v}	1.93^{qr}	2.74^{q-t}	14.96^{p-r}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	0.0634^{q-t}	22.20^{n}	11.65^{q-s}	2.43^{pq}	3.04^{p-s}	16.98^{no}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	0.0831^{j-n}	26.10^{jk}	15.04^{mn}	5.43^{k}	7.25^{lm}	25.50^{jk}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	0.1166^{de}	30.32^{e}	25.98^{fg}	7.63^{e-g}	9.10^{e-h}	28.66^{e-h}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	0.1016^{f-i}	28.32^{g}	23.64^{i}	6.93^{hi}	8.80^{g-i}	27.16^{hi}
	*Azetobacter*No fertilizer*	0.0931^{h-k}	27.32^{h}	16.02^{lm}	6.43^{ij}	7.75^{kl}	27.04^{hi}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	0.1433^{ab}	34.36^{b}	28.66^{bc}	9.20^{b}	10.33^{bc}	36.66a
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	0.1166^{de}	30.30^{e}	25.64^{gh}	7.43^{f-h}	8.90^{f-i}	30.16c-e
Azad	*No inoculation*No N fertilizer*	0.0616^{q-t}	19^{q}	9.43u-w	2.43^{pq}	2.94^{p-t}	13.56r
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	0.0649^{p-t}	21.50^{no}	10.55s-u	2.93^{op}	3.25^{o-r}	15.96^{op}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	0.0684^{p-s}	23.23^{m}	11.98p-r	3.43^{no}	3.55^{n-p}	17.98^{n}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	0.0982^{f-h}	27.33^{h}	16.98^{kl}	6.93^{hi}	8.25^{i-k}	28.06^{gh}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	0.1533^{a}	35.06^{ab}	30.83^{a}	9.86^{a}	11.50^{a}	37.66^{a}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	0.1216^{cd}	31.36^{d}	26.64^{e-g}	7.93^{d-f}	9.40^{d-g}	31.16^{cd}
	*Azetobacter*No fertilizer*	0.0881^{i-m}	27.13^{hi}	16.04^{lm}	5.93^{jk}	7.72^{kl}	27.16^{hi}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	0.01216^{cd}	31.33^{d}	27.00^{d-f}	8.13^{c-e}	9.60^{d-f}	29.66^{d-f}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	0.1066^{e-h}	29.21f^{g}	24.64^{hi}	7.43^{f-h}	9.10^{e-h}	28.16^{f-h}
Hashem	*No inoculation*No N fertilizer*	0.0716^{n-r}	21.00^{op}	11.16^{r-t}	3.43^{no}	3.44^{n-q}	15.56^{o-q}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	0.0749^{m-q}	23.53^{lm}	12.59^{pq}	3.93^{n}	3.75^{no}	18.13^{n}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	0.0784^{l-p}	25.23^{k}	14.01^{no}	4.43^{m}	4.05^{n}	19.98^{m}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	0.1082^{d-g}	29.33^{f}	18.01^{k}	7.43^{f-h}	8.75^{g-i}	29.95^{de}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	0.1416^{ab}	35.36^{a}	29.73^{ab}	9.80^{a}	10.83^{b}	36.83^{a}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	0.1316^{bc}	33.32^{c}	27.55c-e	8.43^{cd}	9.90^{cd}	33.10^{b}
	*Azetobacter*No fertilizer*	0.0981^{f-i}	29.11^{fg}	17.04^{kl}	6.43^{ij}	8.22^{i-k}	29.16^{efg}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	0.1316^{bc}	33.32^{c}	28.00^{cd}	8.63^{c}	10.10^{cd}	31.66^{bc}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	0.1166^{de}	31.20^{de}	25.58^{gh}	7.93^{d-f}	9.80^{c-e}	30.06^{de}
Mahali	*No inoculation*No N fertilizer*	0.0529^{t}	17.20^{r}	7.83^{x}	0.93s	1.90^{u}	11.16^{s}
	*No inoculation*10 kg Nitrogen*	0.0572^{r-t}	19.53^{q}	9.25^{vw}	1.43rs	2.24^{tu}	14.23^{qr}
	*No inoculation*20 kg Nitrogen*	0.0604^{q-t}	21.28^{n-p}	10.67^{s-u}	1.93^{qr}	2.55^{r-u}	16.09^{op}
	*Azesperilluim*No fertilizer*	0.0801^{l-o}	24.17^{l}	13.05^{op}	4.93^{l}	6.75^{m}	23.20^{l}
	*Azesperilluim*10 kg Nitrogen*	0.1116^{d-f}	28.33^{g}	24.00^{i}	7.13^{gh}	8.60^{h-j}	25.66^{ij}
	*Azesperilluim*20 kg Nitrogen*	0.0966^{g-j}	26.35^{ij}	21.65^{j}	6.43^{ij}	8.30^{i-k}	24.16^{kl}
	*Azetobacter*No fertilizer*	0.0901^{i-l}	25.35^{k}	14.03^{no}	5.93^{jk}	7.88^{j-l}	24.11^{kl}
	*Azetobacter*10 kg Nitrogen*	0.1216^{cd}	31.06^{de}	25.72^{f-h}	8.13^{c-e}	10.00^{cd}	31.66^{bc}
	*Azetobacter*20 kg Nitrogen*	0.1116^{d-f}	28.32^{g}	23.65^{i}	6.93^{hi}	8.40^{h-k}	27.16^{hi}

میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within each column with a letter in common are not significantly different at $\alpha = 0.05$.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده گردید استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد در ارقام مختلف اثرات مثبت و معنی‌داری بر گیاه نخود در مواجهه با تنش خشکی آخر فصل داشت، به‌طوری که سبب بهبود سنتز کلروفیل a و b و نیز افزایش تولید ترکیبات کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) گردید. معمولاً در غرب ایران نخود در مناطقی کشت می‌شود که رطوبت خاک محدودکننده و با خشکی انتهای فصل همراه است. زمین‌های این مناطق معمولاً از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، نامناسب هستند. در چنین مناطقی سیستم ریشه‌ای مناسب برای جذب حداکثر آب محدود موجود در خاک می‌تواند در ثبات عملکرد مؤثر باشد. استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد در ارقام مختلف دارای تأثیر بسیار معنی‌داری بر سیستم ریشه ارقام نخود در این پژوهش بود.

منابع

1. Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Zaefizadeh, M., and Shahbazi, H. 2011. Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. Journal of Applied Sciences Research 7 (3): 236-246.
2. Ardalani, Sh., Saedi, M., Jalali Honarmand, S., Ghobadi, M.A., and Abdoli, M. 2014. Physiological responses and antioxidant enzymes activity in bread wheat genotypes under drought stress after anthesis. Crop Physiology 6(21): 45-59.
3. Azadi S., Siadat, A., Naseri, R., Soleymanifard, A., and Mirzaei, A. 2013. Effect of integrated application of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillium brasilense* and nitrogen chemical fertilizers on qualitative and quantitative of durum wheat. Journal of Crop and Ecophysiology 5(26): 129-146. (In Persian with English Summary).
4. Bashan, Y., Levanony, H., and Mitiju, G. 1989. Changes in proton efflux of intact wheat root induced by *A. brasilense* Cd. Canadian Journal of Microbiology 35: 691-697.
5. Bencze, S., Bamberger, Z., Janda, T., Balla, K., Bedő, Z., and Veisz, O. 2011. Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities. Central European Journal of Biology 6(3): 376-387.
6. Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Chakraborty, A.P., and Dey P.L. 2013. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 29: 789-803.
7. Chance, B., and Maehly, A.C. 1995. Assay of Catalase and Peroxidase. In: S.P. Culowic and N.O. Kaplan (Eds). Methods in Enzymology Vol. 2. Academic Press. Inc. New York, 764-765.
8. Cohen, A.C., Bottini, R., and Piccoli, P.N. 2008. Azospirillum brasilense Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. Plant Grow Regular 54: 97-103
9. Creus, C.M., Sueldo, R.J., and Barassi, CA. 2004. Water relations and yield in *Azospirillum*- inoculated wheat exposed to drought in the field. Canadian Journal of Botany 82: 273-281.
10. Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, EM., Pereyra, M.A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Barassi, C.A., and Lamattina, L. 2005. Nitric oxide is involved in the Azospirillum brasilense-induced lateral root formation in tomato. Planta 221: 297-303.
11. Esfandiari, E., Shakiba, M.R., Mahboob, S.A., Alyari, H., and Toorchi, M. 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. Journal of Food, Agriculture and Environment 5: 149-153.
12. Esfandiari, E., and Vahdati R.D.A. 2012. Decline of tolerance in leaf photooxidative-stree with age in sunflower. Journal of Plant Biology 14: 1-14.
13. German, M.A., Burdman, S., Okon, Y., and Kigel, J. 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. Biology and Fertillity of Soils 32: 259-264.
14. Gregersen, P.L., and Holm, P.B. 2007. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat. Plant Biotechnology Journal 5: 192-206.
15. Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S., and Sahin, O. 2006. Antioxidant and stomatal response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. Science Horticulture 110: 279-284.
16. Heidari, M., Miri, H.R., and Minaei, A. 2013. Antioxidant enzymes activity and biochemical components in borage (*Borago officinalis* L.) response to water stress and humic acid treatment. Environmental Stresses in Crop Science 6(2): 159-170. (In Persian with English Summary).
17. Heidari, M., and Karami, V. 2013. Study the effect of drought stress and mychorizal strains on grain and its components of chlorophyll content and biochemical componends in sufflower. Envirenmental Stresse in Crop Sciences 6(1): 17-26. (In Persian with English Summary).
18. Hamidi, A., Chaokan, R., Asgharzadeh, A., Dehghanshoar, M., Ghalavand, A., and Malakouti, M.J. 2009. Effect of plant growth promoting rhizobateria (PGPR) on phonology of late maturity maize (*Zea mays* L.) cultivars. Iranian Journal of Crop Science 11 (3): 249-270. (In Persian with English Summary).
19. Heidari, M., and Golpayegani, A. 2011. Effects of water stress and inoculation withplant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 11: 57-61.
20. Jongrungklang, N., Toomsan, B., Vorasoot, N., Jogloy, S., Boote, K.J., Hoogenboom, G., and Patanothai, A. 2012. Classification of root distribution patterns and their contributions to yield in peanut genotypes under midseason drought stress. Field Crops Research 127: 181-190.

21. Kaur, R., Bains, T.S., Bindumadhava, H., and Nayyar, H., 2015. Responses of mungbean (*Vigna radiata* L.) genotypes to heat stress: Effects on reproductive biology, leaf function and yield traits. Scientia Horticulture. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.015.
22. Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Moradi, R., and Mansoori, H. 2014. Assessing sustainable agriculture development status in Iran and offering of sustainability approaches. Agricultural Knowledge and Sustainable Production 23(4): 179-197.
23. Manske, G.G.B., Luttger, A.B., Behl, R.K., and Vlek, P.L.G. 1995. Nutrient efficiency based on VA mycorrhiza (VAM) and total root length of wheat cultivars grown in India. Journal of Applied Botany 69: 108-110.
24. Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., and Lamattina, L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and itsinfluence on root architecture in tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions 2: 1001-1009.
25. Nadeem, S.M, Zahir, Z.A, Naveed, M., and Arshad, M. 2007. Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. Canadian Journal of Microbiology 53: 1141-1149.
26. Naseri, R., Siyadat, S.A., Soleymani Fard, A., Soleymani, R., and Khosh Khabar, H. 2011. Effects of planting date and density on yield, yield components and protein content of three chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under rainfed conditions in Ilam province. Iranian Journal of Pulses Research 2(2): 7-18. (In Persian with English Summary).
27. Naveed, M., Baqir Hussain, M., Zahir, Z.A., Mitter, B., and Sessitsch, A. 2014. Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. Plant Growth Regular 73: 121-131.
28. Ramachandra-Reddy, A., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P., and Sumithra, K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. Environmental and Experimental Botany 52(1): 33-42.
29. Saghafi, K., Ahmadi, J., Asgharzadeh, A., and Bakhtiari, S. 2013. The effect of microbial inoculants on physiological responses of two wheat cultivars under salt stress. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 1(4): 421-431.
30. Sairam, R.K., and Srivastava, G.C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. Journal of Agronomy Crop Science 186: 63-70.
31. Sheteawi, S.A., and Tawfik, K.M. 2007. Interaction effect of some biofertilizers and irrigation water regime on Mungbean (*Vigna radiate*) growth and yield. Journal of Applied Sciences Research 3(3): 251-262.
32. Stewart, R.R., and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology 65(2): 245-248.
33. Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., and Bandi, V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interactions 6: 1-14.
34. Wang, Y.J., Wang, H.M., Yang, C.H., Wang, Q., and Mei, R.H.. 2007. Two distinct manganese-containing superoxide dismutase genes in *Bacillus cereus*: their physiological characterizations and roles in surviving in wheat rhizosphere. FEMS Microbiology Letters 272: 206-213.
35. Wu, Y., Thorne, E.T., Sharp, R.E., and Cosgrove, D.J. 2001. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. Plant Physiology 126: 1471-1479.
36. Xu, P.L., Guo, Y.K., Bai, J.G., Shang, L., and Wang, X.J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. Physiologia Plantarum 132: 467-478.
37. Yang, J., Kloepper, J.W., and Ryu, C. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Science 14: 1-4.
38. Yousefpour, Z., Yadvi, A., Balouchi, H.R., and Farajee, H. 2014. Evaluation of yield and some of physiological, morphological and phonological charactresticcs in sunflower (*Helianthus annuus* L.) influenced by biological and chemical fertilizerof nitrogen and phosporous. Journal of Agroecology 6(3): 508-519. (In Persian with English Summary).
39. Zahir, Z.A., Munir, A., Asghar, H.N., Arshad, M., and Shaharoona, B. 2008. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. Journal of Microbiol Biotechnology 18: 958-963.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 2, 2019, p. 62-76 (Research Article)

The effect of Plant Growth Promoting Rhizohacteria on activities of antioxidative enzymes, physiological characteristics and root growth of four chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under dry land conditions of Ilam privince

Naseri[1*], R., Soleymani Fard[2], A., Mirzaeir[3], A., Darabi[1], F. & Fathi[4], A.

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (rahim.naseri@gmail.com; m.darabi8161@gmail.com, respectively)
2. Faculty Member, Department of Agriculture, Pyame Noor University, P.O.BOX: 19395-3697, Tehran, I.R. of Iran, soleymani877@gmail.com
3. Crop and Horticultural Science Research Department, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ilam, Iran, amir.mirzaei53@gmail.com
4. Young Researchers and Elite Club, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Received: 8 May 2017
Accepted: 20 January 2018

DOI: 10.22067/ijpr.v10i2.64299

Introduction

Chickpea is widely cultivated as an important cool season grain legume crop throughout the world. According to FAO, Iran is one of the major chickpea (*Cicer arietinum* L.) producing countries in the world. In Iran, chickpea is the most important pulse crop with respect to production and area under cultivation. This crop is cultivated in about 500,000 ha, of which over 95 percent are grown under rainfed conditions. Average chickpea yield in Iran is about 400 to 600 kg.ha^{-1}, that is well below the world average of 900 kg.ha^{-1}. Drought and high temperature are two major factors limiting the growth and productivity of chickpea during summer in many regions. Drought stress is common in many parts of the world and more than 50% of the globe is arid or semi arid and plants are subjected to some level of drought stress. Drought stress can adversely affect plant growth and production. Plant response to drought stress, at cellular and molecular level, limits plant growth and yield. It has been shown that several PGPR can support plants by producing antioxidant factors or modulate photosynthesis decreasing ROS and thus lowering the need for antioxidant activity during stress which could explain why primed plants tend to decrease their own antioxidant defense system. Over reduction of the photosynthetic electron transport chain induces the generation of reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ($1O_2$), superoxide anion (O_2•-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (•OH). Therefore, the decline in growth and productivity due to these stress factors is associated with increased levels of ROS, which cause damage to cellular structures and macromolecules. In order to maintain or increase crop productivity it becomes necessary to evolve efficient low-cost technologies for abiotic stress management. It is now a priority area research for developing strategies to cope with abiotic stresses including development of stress tolerant varieties, shifting crop calendars, resource management practices etc. However, most of these techniques are cost-intensive and time taking. Recent studies indicate that soil microorganisms can help crops withstand abiotic stresses more efficiently. These include tolerance to salt and water stress (*Azospirillum sp., Pseudomanas sp, Bacillus sp*). The increased H_2O_2 content under stress conditions led to lipid peroxidation, which is widely used as an indicator of stress-induced oxidative damage. The relative water content (RWC) and lower electrolyte ion leakage (EL) in plants exposed to drought has been considered indicative of a relative tolerance to water stress. In our study, RWC declined while %EL increased in both inoculated and uninoculated seedlings under drought stress compared to normal irrigation. However, bacterial inoculation did help plants to increase their RWC and to decrease their %EL as compared with uninoculated plants in drought stress. Investigations involving wheat species and varieties have detected increases in the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and non-specific peroxidase (guaiacol peroxidase, POD). The main objective was to evaluate the effects of Plant Growth Promoting Rhizohacteria on activities of antioxidative enzymes, physiologic traits and root growth of chickpea in dry land conditions of Ilam province.

*** Corresponding Author:** rahim.naseri@gmail.com

Materials & Methods

To evaluate the effect of Plant Growth Promoting Rhizohacteria on activities of antioxidative enzymes, physologiceal charactersitices and root growth of chickpea under dry land conditions of Ilam province, an experimental field was conducted using factorial arrangement based on randomized complete block design with three replications at Agricultural Research Research Center of Ilam during 2014-2015. Studied factors included cultivars (Azad, Hashem, Arman and locallandrace) and Plant Growth Promoting Rhizohacteria (without inoculation, 10 kg nitrogen, 20 kg nitrogen, *Azospirillum* + without nitrogen, *Azospirillum* + 10 kg nitrogen, *Azospirillum* + 20 kg nitrogen, *Azetobacter* + without nitrogen, *Azetobacter* + 10 kg nitrogen, *Azetobacter* + 20 kg nitrogen. Cultivars were sown on 16 November, 2013. Eeight rows with 30 cm width and 4 m long were designed during the growth season, hand weeding was done in necessary times. Studied traits were included of chlorophyll a and b, RWC, MAD, SOD, POD, CAT, root volum, dray root weight and main root length. The data were analyzed statistically by SAS program and the data means were compared by Duncan's multiple range test (DMRT).

Results & Discussion

The interaction effect between cultivars× PGPR on chlorophyll a and b, RWC, MAD, SOD, POD, CAT, root volume, dry root weight and main root length were significant. Application of nitrogen and PGPR in different cultivars provided better nutrition condition for plant growth by reducing reactive oxygen species (ROS) because these bacteria need these elements to grow and development. PGPR inoculation significantly increased the contents of chlorophyll a and b, RWC and decresed MAD content in chickpea plants. PGPR improved water status, enhance its defense system, and alleviate oxidative damage caused by drought stress. Drought stress damage decrease, evaluated as MDA content, has been observed under different stress conditions in PGPR. The improved plant growth under dry land farming was also observed in chickpea by inoculation of PGPR and application of N, which was found to be associated with enhanced, root system in field grown under rainfed condition.

Conclusion

Under dry land condition, due to the generation of reactive oxygen species, an efficient antioxidant system is needed in the plant. It has been observed that PGPR increase the activity of antioxidant enzymes of host plants. Study conducted on chickpea under dry land conditions showed that PGPR enhanced the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, peroxidase and catalase compared to those in un-inoculated control plants.

Keywords: Antioxidant, Chlorophyll content, Grain yield, Wter use efficiency